

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* Y
MYCOBACTERIUM LEPROMATOSIS EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN”**

Por

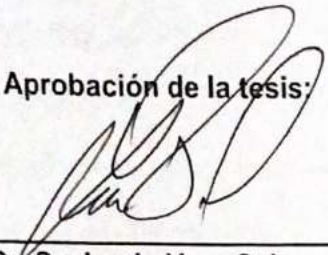
DR. CESAR JAIR RAMOS CAVAZOS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALIDAD EN DERMATOLOGÍA.**

FEBRERO 2021

**"EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* Y
MYCOBACTERIUM LEPROMATOSIS EN EL ESTADO DE NUEVO
LEÓN"**

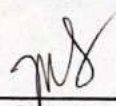
Aprobación de la tesis:



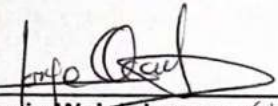
Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera
Director de tesis



Dra. Carmen Amelia Molina Torres
Co-Director de Tesis

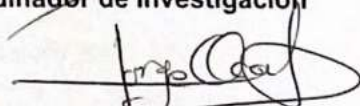


Dra. med. Minerva Gómez Flores
Coordinador de enseñanza

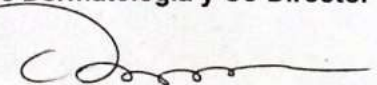


pp

Dr. med. Oliverio Welsh Lozano (†)
Coordinador de Investigación



Dr. med. Jorge de Jesús Ocampo Candiani
Jefe del Servicio de Dermatología y Co-Director de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, primeramente, al Dr. Lucio Vera quien, por su apoyo incondicional, guía y paciencia, hizo este proyecto posible. A la Dra. Carmen Molina, por siempre mostrar disposición a ayudarme ante cualquier dificultad que encontraba, por enseñarme desde lo más básico a lo más complejo, siempre con la mejor actitud, desde que era Estudiante de Preparatoria. A las Químicas Wendy, Anabel y Mayra, por mostrarme lo maravilloso que es la ciencia básica. A Carlos Paz, por enseñarme que el trabajo duro tiene sus recompensas. A mis compañeras Ana Gaby y Paty que, durante su Servicio Social, hicieron de este, un trabajo sobresaliente.

A el Dr. Jorge Ocampo y la Dra. Minerva Gómez por su apoyo, confianza y consejos, que hicieron mi último año de la residencia, el mejor de todos. A mis compañeros, en especial a Adrián, Anabella, Jessica y Llibrán, por estar presentes en momentos de dicha y dificultad. A mis maestros y el personal administrativo, enfermería y trabajo social, por permitir desarrollar mi potencial como Dermatólogo, sin dejar de lado la importancia del trabajo en equipo.

Y por último y no por ello menos importante, a mi familia por su constante motivación y fuerza que me proporcionaron durante mis cuatro años de residencia. Todo esto por y para ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESUMEN	1
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN	3
Capítulo III	
3. ANTECEDENTES	6
Capítulo IV	
4. IMPORTANCIA	15
Capítulo V	
5. ORIGINALIDAD	16
Capítulo VI	
6. JUSTIFICACIÓN	17
Capítulo VII	
7. HIPÓTESIS	18
Capítulo VIII	
8. OBJETIVOS	19
Capítulo IX	
9. MATERIAL Y MÉTODOS	20
Capítulo X	
10. RESULTADOS	27
Capítulo XI	
11. DISCUSIÓN	42

Capítulo XII

12.CONCLUSIÓN	45
--------------------------------	-----------

Capítulo XIII

13.REFERENCIAS	46
---------------------------------	-----------

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Página
1. Primers para identificación de especie	23
2. Primers utilizados para SNP	25
3. Origen geográfico de los pacientes	28
4. Concentración de ADN de biopsias de pacientes	30
5. Relación de muestras de armadillo	33
6. Relación de muestras de tierra	38
7. Tipos y subtipos de SNP identificados	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Patrones de bandas de PCR-RFLP de cuatro cepas de <i>M. leprae</i> de referencia (T53, 3039, N63, BR). La longitud de las bandas, antes y después de la digestión, es clave para identificar el tipo de SNP de la cepa estudiada	. . 26
2. Subtipo clínico de la enfermedad	28
3. Biopsia de piel de armadillo (10x, Fitte Faraco), donde se aprecian múltiples bacilos ácido alcohol-resistentes en dermis superficial y profunda	 34
4. Biopsia de pulmón de armadillo (10x, Fitte Faraco), donde se aprecian múltiples bacilos ácido alcohol-resistentes formando globias en los alveolos pulmonares	35
5. Biopsia de hígado de armadillo (10x, Fitte Faraco), donde se aprecian múltiples bacilos ácido alcohol-resistentes	36
6. Analisis por PCR, positivo para la presencia de <i>M. leprae</i> en Hígado, Pulmón y Piel de Oreja en el Armadillo 1 (A1)	37

LISTA DE ABREVIATURAS

TN: Tamil, Nadu.

OMS: Organización Mundial de la Salud

ADN: Ácido desoxirribonucleico

SNP: Polimorfismos de nucleótido único

STR: Secuencias de tipo microsatélite

Col: Colaboradores

VNTR: Número variable de repeticiones en tándem

μm: Micrómetros

LAM: Lipoarabinomananos

pb: Pares de bases

G: Guanina

C: Citosina

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

μL: Microlitro

mg: Miligramo

ml: Mililitro

°C: Grados centígrados

Min: Minutos

SDS: Dodecilsulfato sódico

M: Molar

CTAB: Bromuro de hexadecil-trimetilamonio

X g: Fuerza centrífuga relativa

mm: Milímetros

PGL-1: Antígeno glicolípido fenólico 1

g: Gramos

cm: Centímetros

CA: California

TAE: Buffer Tris-Acetato-EDTA

TE: Buffer TE

UV: Ultravioleta

RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

LL: Lepra lepromatosa

LD: Lepra Dimorfa

LT: Lepra Tuberculoide

LI: Lepra indeterminada

LH: Lepra histioide

CAPÍTULO I

1. RESUMEN

La enfermedad de Hansen -Lepra- es una enfermedad crónica que afecta la piel y el sistema nervioso, la cual resulta de la infección por el patógeno no cultivable *Mycobacterium leprae* (1). La secuenciación de la totalidad del genoma de una cepa TN de la micobacteria (Originaria de Tamil, Nadu, India), ha permitido un mayor entendimiento en la dinámica de transmisión y filogenia del bacilo causante de la enfermedad (1).

La lepra no existía en el Nuevo Mundo en la era pre-Colombina y parece haber sido introducida en el hemisferio occidental después de la conquista española (2).

Se aceptaba de forma generalizada que la Lepra resultaba solamente de transmisión del microorganismo causante de forma directa entre seres humanos; pero en años recientes, ha habido evidencia creciente sobre casos de transmisión zoonótica por exposición estrecha a armadillos de nueve bandas infectados (*Dasypus novemcinctus*) (3,4). Además, en 2008 se identificó una especie diferente en un paciente con manifestaciones clínicas de lepra lepromatosa difusa: *Mycobacterium lepromatosis* (5,6).

El objetivo del presente proyecto fue correlacionar epidemiológica y filogenéticamente los hallazgos moleculares de aislamientos clínicos (Biopsias de piel) provenientes de pacientes de la clínica de Lepra de nuestro hospital y especímenes de *D. novemcinctus* (Tejido del sistema retículo endotelial) originarios de la sierra madre oriental para finalmente compararlos con los resultados documentados en la literatura regional y mundial.

CAPÍTULO II

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Hansen (o Lepra), es una enfermedad infecciosa causada en la mayor parte de los casos por *Mycobacterium leprae*; afecta el sistema nervioso periférico y el sistema tegumentario. Se considera una enfermedad endémica, que ocurre principalmente en áreas tropicales y subtropicales. Sin embargo, en 2011, la OMS registró 219,075 casos nuevos globalmente y 439,670 nuevos casos reportados en el hemisferio occidental durante la última década (7).

Los polimorfismos genómicos, permiten el rastreo histórico de la diseminación de la enfermedad por el mundo y confirmar el origen regional de la mayoría de los aislamientos (8). La disparidad entre la prevalencia y los reportes de casos nuevos a lo largo de la historia, enfatiza la falta de conocimiento acerca de la transmisión y el periodo de incubación de la enfermedad.

Se han propuesto diferentes abordajes para resolver estas interrogantes, sin embargo se dificultan por la falta de conocimiento sobre la epidemiología de la enfermedad, las fuentes de infección, el modo preciso de transmisión y la importancia de los patrones de contacto y transmisibilidad. Avances recientes en genotipificación de bacterias, basadas en la identificación de inserciones y deleciones de ADN, polimorfismos de nucleótido único (SNPs) y otras

estructuras polimórficas de ADN, como los microsatélites, han revolucionado el entendimiento de los orígenes, migración, resistencia antimicrobiana y diseminación de las enfermedades infecciosas (9).

La disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *M. leprae* ha resultado en la descripción de más de 50 loci de microsatélites (STR) los cuales han sido evaluados como potenciales herramientas de genotipificación. Al menos la mitad de estos STR han sido parcialmente caracterizados y muestran polimorfismos entre los aislamientos de *M. leprae* de humanos, primates no humanos y armadillos seleccionados de diferentes partes del mundo (9). En 2009, Gillis T y cols., utilizaron esta herramienta de tipificación para definir la distribución geográfica de *M. leprae* en diferentes regiones endémicas del mundo, con el objetivo de entender fuentes de infección y patrones de transmisión de la enfermedad.

Además de los seres humanos, animales como el armadillo de nueve bandas de América (*Dasypus novemcinctus*), y la ardilla roja de las islas británicas (*Sciurus vulgaris*) se encuentran naturalmente infectados con *M. leprae* (10,11). Datos genómicos de cepas de *M. leprae* de armadillos salvajes y ardillas rojas muestran que los humanos fueron responsables de la introducción de *M. leprae* a estas especies. Sharma y Cols. demostraron que el rango geográfico y la complejidad zoonótica de Lepra se están extendiendo. Ellos evaluaron 645 armadillos de 8 sitios de Estados Unidos, y se encontró que el 16.4% de los animales tenía evidencia serológica y genética de infección por el

bacilo *M. leprae* (). Ellos utilizaron SNP-VNTR y secuenciación genómica, donde detectaron dos genotipos distintos en dos grupos de armadillos. En comparación, 42.3% de los pacientes humanos que fueron estudiados en este estudio, se encontraron que estaban infectados con uno de los 2 genotipos de *M. leprae* asociados con armadillos (12).

Asimismo, se ha reportado infección en primates no humanos, pero aún no se determina si esto ocurre como infección incidental por las cepas de *M. leprae* que afectan a los seres humanos o por cepas de *M. leprae* que tienen tropismo por primates no humanos (13). En 2017 Honap y Cols., secuenciaron los genomas completos de tres cepas de *M. leprae* que infectaron a primates no humanos, donde se encontró que este patógeno puede ser transmitido de humanos a primates no-humanos así como entre diferentes especies de primates no humanos (13).

Se necesitan nuevas estrategias para detectar la lepra y prevenir su diseminación. La genotipificación molecular de *M. leprae* habilita la aplicación de nuevos principios de la salud pública moderna para el control de enfermedades mediante la identificación de fuentes de infección y brotes nuevos.

CAPÍTULO III

3. ANTECEDENTES

3.1 Epidemiología global

La enfermedad de Hansen (Lepra) es una enfermedad reconocida desde tiempos bíblicos. Armeur Hansen fue quién descubrió el bacilo en 1873 en Bergen, Noruega, con este descubrimiento *M. leprae* se convirtió en el primer patógeno asociado a una enfermedad humana (14).

Fue hasta el año de 1953 que el primer comité de expertos de la OMS en lepra se reunió en Río de Janeiro, Brasil; pero los primeros datos globales sobre la prevalencia de la enfermedad se publicaron hasta el año de 1966. En ese momento, la OMS estimaba el número global de pacientes con lepra en 10.786.000, aunque probablemente el número de casos estaba por encima de esa cifra. Durante el periodo de 1960 a 1980 el número global de pacientes reportados con lepra se mantuvo estable, de 10 a 12 millones (15).

En 1982 se aprobó el uso generalizado de la terapia multibacilar, lo cual tuvo como resultado una reducción drástica del número de casos; para el año de 1991, el número global de pacientes con lepra se redujo a 5,5 millones; esto llevó a los miembros de la 44ª sesión de la Asamblea Mundial de la Salud a

aprobar la resolución WHA 44.9 (La eliminación de la lepra como problema de salud pública para el año 2000), es decir, la reducción de la prevalencia de la enfermedad a un nivel inferior a 1 caso por 10.000 habitantes (15).

El número de pacientes con lepra detectados cada año entre 2000 y 2006 disminuyó significativamente de 719,219 pacientes en el año 2000 a 265,661 en 2006 (15). La disminución se debió principalmente al menor número de pacientes con lepra identificados en las regiones del mundo que todavía reportan el mayor número de casos (Es decir, el sudeste de Asia y África) (15). La disminución en el número de pacientes anuales comenzó a acelerarse drásticamente en 2006: se reportaron 265,661 pacientes en 2006 y 215,656 en 2013 (15).

Para el año 2016 la OMS presentó un registro de la prevalencia de la lepra en cada región del mundo así como el número de casos nuevos, siendo la primera al final del año de 171,948 casos con una tasa de 0.23 por 10,000 habitantes, siendo inferior a la cifra del 2015 la cual fue de 176,176 casos con una tasa de 0.27 por 10,000 habitantes (16)

Por último los datos globales y regionales reportaron un incremento del número de casos nuevos reportados con un total de 214,783 con una tasa de 2.9 por 100,000, superior a la cifra de 211,973 reportada en el 2015; se cree que esto es debido a la mayor participación de los países en las campañas y programas para la detección de esta enfermedad (16).

3.2. Situación en México

La lepra es una enfermedad endémica de México desde hace varios siglos. Según un estudio en base al seguimiento de patrones clonales, se sabe que la lepra se extendió por el mundo durante los últimos 100,000 años y se cree que esta llegó a México a través de los migrantes mongoles que pasaron por el estrecho de Bering en Alaska, ya que sus rutas migratorias coinciden también con las zonas donde *M. lepromatosis* (estados del pacifico mexicano) es endémica (17).

Durante el año de 1960 la entonces Secretaría de Salubridad y Asistencia, creó el Programa Nacional para el Control de la Lepra, designando al Dr. Fernando Latapí como su director, quien compartió la organización con otros dermatoleprólogos. El objetivo de este programa era identificar el mayor número de casos de lepra para otorgarles tratamiento, el cual en ese momento y hasta 1990 consistía solo en dapsona (18); en ese mismo año (1990) con la implementación de la terapia multibacilar, la lepra pasó de tener una prevalencia de 16,694 casos (2.6 por 100 000 habitantes), a menos de 1 caso por 10,000 habitantes en 1994, lo cual cumplía con la meta establecida por la OMS para la eliminación de la Lepra, siendo 243 el número de casos nuevos para el año 2008 (17).

Según datos oficiales (18) para el cierre de 2012 aún se tenían 21 municipios con tasa de prevalencia mayor a 1 por 10 mil, no obstante, desde que se alcanzó dicha meta a nivel nacional, el número de casos nuevos detectados anualmente ha seguido un descenso constante, con una considerable reducción de la carga de enfermedad.

Al final del año del 2017 se tenía un total de 138 casos reportados siendo los estados de Sinaloa, Jalisco, Guerrero y Nuevo León los más afectados. (19)

3.3. Taxonomía

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae*; son bacilos que se caracterizan por ser acido-alcohol resistentes y por la presencia de ácidos micólicos en su pared celular (20).

Cuentan con una envoltura similar a las bacterias grampositivas, pero a diferencia de estas, los componentes unidos a los peptidoglicanos son de naturaleza lipídica, contrastando con las proteínas y lipopolisacáridos presentes en las bacterias (21).

3.4. Descripción del género

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos de 3 a 5 µm de longitud, curvos o en forma de maza, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, que poseen una resistencia mayor a la

tinción por los colorantes comunes, pero una vez teñidos son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido. Las micobacterias son altamente resistentes a la desecación y permanecen viables en el esputo desecado de seis a ocho meses cuando están protegidas de la luz solar. Son en general más resistentes a los agentes desinfectantes que otras formas vegetativas pero son destruidos por procedimientos de pasteurización. De acuerdo a sus requerimientos atmosféricos algunos son aerobios y otros microaerófilos (21).

Poseen una envoltura que consta de membrana plasmática y pared celular. La membrana plasmática de las micobacterias aparece en cortes ultrafinos como una membrana biológica trilaminar clásica, es decir, dos capas electrón-densas separadas por una capa transparente. Sin embargo, tiene como característica la presencia de moléculas de lipopolisacáridos, lipoarabinomananos (LAM), lipomananos y fosfatidil-inositol-manósidos. En cuanto a la velocidad de crecimiento algunas especies son de crecimiento rápido y otras de crecimiento lento. Se destaca en su estructura una gran riqueza en lípidos (20-60%). El contenido de bases de guanina más citosina en la molécula de ADN es de 62 a 70 moles (21).

Timpe y Runyon propusieron una clasificación útil de *Mycobacterium* en cuatro grupos, que se basa en la velocidad de crecimiento (rápido o lento, según sea superior o inferior a una semana), producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógeno, escotocromógeno y no

cromógeno) y características macroscópicas y microscópicas de sus colonias (21).

Aquellas micobacterias no comprendidas en los complejos de tuberculosis o de lepra, se engloban bajo el término de micobacterias atípicas (21).

3.5. Genoma

Han y cols., lograron identificar una nueva especie de *Mycobacterium* tras el análisis molecular en tejido hepático de 2 pacientes que murieron por Lepra Lepromatosa Difusa (5). Ellos encontraron diferencias genéticas significativas en comparación con *M. leprae*, tras el análisis de seis genes representativos, donde se observó una divergencia del 2.1% a nivel del gen del ARN Ribosomal 16S y variaciones similares en otros 5 genes menos conservados desde el punto de vista evolutivo.

M. leprae y *M. lepromatosis* muestran aproximadamente un 88% de similitud genética, comparten muchas características comunes, como una reducción del tamaño total del genoma (en relación con otras micobacterias) de aproximadamente 3,2 millones de pares de bases (pb), una organización del genoma similar y la incapacidad de crecer fuera de un huésped vivo (13).

La secuencia completa del genoma de *M. leprae*. contiene 3,268,203 pares de bases (pb) y tiene un contenido promedio de G + C de 57.8%. El 49,5% del genoma de *M. leprae* contiene genes codificantes de proteínas, 27% contiene pseudogenes reconocibles que son funcionales en el bacilo tuberculoso, pero que aparecen inactivos en *M. leprae*, el 23.5% restante del genoma no parece estar codificado. El análisis del proteoma comparativo detectó solo 391 especies solubles de proteínas, en comparación con las 1,800 en *M. tuberculosis*, lo que indica que los pseudogenes son inertes a la traducción. De manera tal que desde que se separó del último ancestro micobacteriano común, el bacilo de la lepra pudo haber perdido más de 2,000 genes, en un proceso conocido como evolución reductiva (22). La evolución reductiva se explica por la selección natural y adaptación al ser humano sedentario y la pérdida de genes no esenciales mediante mutaciones sin sentido, inserciones o deleciones en especies parasitarias de los hombres (23).

3.6. Zoonosis

El único reservorio no humano conocido de *M. leprae* es el armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*), y las tasas de prevalencia de la enfermedad entre los armadillos pueden superar el 20% en algunas localidades. Los armadillos son altamente susceptibles a *M. leprae* y pueden manifestar cargas masivas de bacilos en sus tejidos (12). Esta infección selvática se detectó por primera vez en 1975, pero se sabe que ocurrió entre los armadillos durante muchas décadas antes de esa época (12).

Aunque se acepta generalmente que la enfermedad ocurre tras la transmisión interhumana, en años recientes existe evidencia creciente de casos secundarios al contacto con armadillos de nueve bandas (12).

Asimismo, el hallazgo de ejemplares de ardillas rojas (*Sciurus vulgaris*) con lesiones características y evidencia de infección por *M. lepromatosis* y *M. leprae* en el análisis histopatológico, serológico y molecular, ha demostrado que dichos animales también son reservorio para la enfermedad en las islas británicas (10).

3.7 Identificación de micobacterias causantes de la enfermedad en muestras de tierra.

Diferentes investigadores han sugerido que el microorganismo causante de la enfermedad (*M. leprae*) puede estar presente en el medio ambiente: suelo, agua, plantas o incluso en otras especies animales incluyendo protozoarios tipo amibas, insectos, peces y los ya reconocidos primates no humanos y armadillos (24–31). El rol del suelo y cuerpos de agua en la transmisión de la enfermedad ha sido descrita en los últimos años; mediante la amplificación por PCR de ADN de *M. leprae*, se ha corroborado su presencia en muestras de suelo y agua, incluso en áreas geográficas no habitadas por pacientes con Lepra en áreas endémicas de Brasil y la India (25,32). De manera tal, que además de humanos y animales, algunas fuentes ambientales pueden actuar también como reservorios de *M. leprae* (32).

3.8. Técnicas de identificación molecular

Las técnicas de tipificación molecular permiten identificar polimorfismos específicos en *M. leprae* y *M. lepromatosis*, lo que permite mejorar el entendimiento de la epidemiología de la Enfermedad. El abordaje actual consiste en el análisis comparativo locus-locus (33). Al ser microorganismos que no crecen en medios de cultivo, las técnicas de amplificación molecular son clave para la identificación específica.

La tipificación molecular es útil para el estudio de la distribución geográfica de las diferentes cepas de *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium lepromatosis* y tiene potencial aplicación para el estudio de la dinámica de transmisión. Esto también provee información sobre la evolución histórica y filogenética del bacilo (8).

Usando genómica comparativa y evidenciando variaciones genéticas discretas (Polimorfismos de nucleótido único –SNP-), Monot y colaboradores encontraron que la enfermedad tiene su origen en el este de África o el oriente medio y fue diseminándose al resto del mundo con las migraciones humanas, siendo los europeos o los africanos del norte quienes introdujeron la enfermedad en el oeste de África y las Américas en los últimos 500 años (8).

La identificación de polimorfismos es útil en el entendimiento de la epidemiología de la enfermedad. Actualmente se utilizan métodos que permiten el análisis de inserciones, deleciones y detección de SNP lo cual es útil en el estudio de la distribución geográfica de las diferentes cepas de *M. leprae* y *M. lepromatosis*, agrupándolos en tipos y subtipos de SNP mediante el uso de herramientas informáticas como el software START (1).

CAPÍTULO IV

4. IMPORTANCIA

La importancia de este trabajo radica en contribuir al diagnóstico molecular de Lepra, en casos de pacientes que por la historia clínica, la exploración física o estudios de laboratorio convencional, no sea posible el diagnóstico definitivo de la enfermedad y la identificación de la dinámica de transmisión y brotes de la enfermedad.

CAPÍTULO V

5. ORIGINALIDAD

Este constituye el primer estudio en su tipo, sobre epidemiología molecular de la enfermedad en muestras de pacientes, armadillos y suelo, en Nuevo León y en México.

CAPÍTULO VI

6. JUSTIFICACIÓN

Se desconocen los genotipos circulantes de *M. leprae* y *M. lepromatosis* en nuestro medio, así como su relación con los genotipos en armadillos de nueve bandas locales y muestras de suelo.

CAPÍTULO VII

7. HIPÓTESIS

Pregunta de investigación

¿Cuáles son las clonas de *M. leprae* y *M. lepromatosis* dominantes en México?

Hipótesis

Las clonas de *M. leprae* y *M. lepromatosis* predominantes en nuestro Estado son comparables a las del resto del país.

CAPÍTULO VIII

8. OBJETIVOS

Objetivo General

Identificación de los genotipos dominantes de *M. leprae* y *M. lepromatosis* en el Estado de Nuevo León y comparar con aislamientos clínicos provenientes de otros centros de referencia del país y la literatura mundial.

Objetivos Específicos

1. Se recolectaron muestras de piel o tejido embebido en parafina de pacientes con enfermedad de Hansen.
2. Se recolectaron muestras de armadillo provenientes del Estado de Nuevo León.
3. Se recolectaron muestras de tierra provenientes del Estado de Nuevo León.

4. Se extrajo el ADN de las muestras e identificar *M. lepre* y *M. lepromatosis*
5. Se genotipificaron las muestra positivas tanto de humanos como de armadillos, mediante análisis de ocho SNPs
6. Se secuenciaron los hallazgos relevantes.

CAPÍTULO IX

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1. Muestras clínicas

Para este estudio se obtuvieron muestras de biopsias de pacientes diagnosticados con la Enfermedad de Hansen. Como criterios de inclusión se incluyeron:

- Pacientes que acudían al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León con diagnóstico histopatológico y baciloscópico de lepra de cualquier subtipo, con o sin tratamiento, que acuden por vez primera o a control de su enfermedad y que tuvieran biopsia de piel.
- Pacientes hombres o mujeres con edad entre 5-90 años, previo consentimiento informado.

Se obtuvieron los datos demográficos de los pacientes como la edad, sexo y origen de nacimiento.

Como criterios de exclusión se incluyeron:

- Pacientes que no contaban con biopsia diagnóstica o de control.
- Pacientes que estuvieron fuera del rango de edad.

9.2. Aislamiento y extracción de ADN micobacteriano.

El aislamiento de ADN se llevó a cabo por el método de Van Embdem (Van Embdem y cols., 1993). Al acudir a biopsia de control, una parte del espécimen se colocó en un tubo de microcentrifuga conteniendo 500 µl de solución TE 1X. Se añadió 50 µl de lisozima (10 mg/ml) mezclando por inversión (20 veces) y se incubó a 37°C toda la noche. Posteriormente se adicionaron 70 µl de SDS al 10 % y 6 µl de proteinasa K (10 mg/ml), de la misma forma se mezcló por inversión (20 veces) y se realizó una incubación a 65°C por 10 min. Se añadieron 100 µl de NaCl 5M, se mezcló por inversión (20 veces) y después se agregaron 80 µl de bromuro de hexadecil-trimetilamonio (CTAB) precalentado a 65°C. La mezcla se agitó en un vórtex hasta que la suspensión se tornó lechosa, se incubó a 65°C por 10 min. Se añadió un volumen igual (0.7 ml) de una mezcla (24:1) de cloroformo/alcohol isoamílico y se agitó en un vórtex por 10 s, se centrifugó a temperatura ambiente por 5 min a 12,000 X g y la capa acuosa fue transferida a un nuevo tubo de microcentrifuga con una micropipeta. Se agregaron 500 µl de isopropanol; después de agitar

levemente los tubos se dejaron a -20°C por lo menos 1 hora, se centrifugaron por 15 min a temperatura ambiente a $12,000 \times g$ y se descartó el sobrenadante. La pastilla de ADN se lavó con 1 ml de etanol frío para remover el CTAB residual y el isopropanol. Los tubos se centrifugaron por 5 min a temperatura ambiente a $12,000 \times g$, se descartó el sobrenadante y la pastilla de ADN se dejó secar al aire. El ADN se disolvió en 50 μl de buffer TE 1X, dejando en incubación a 37°C por 30-60 min.

Para evaluar la cantidad y la calidad del ADN se utilizó un biofotómetro (Biophotometer Eppendorf, Hamburg, Germany) y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

9.3. Extracción de ADN de *M. leprae* y *M. lepromatosis* de bloques de parafina.

Para la extracción de ADN de las muestras de patología que se encontraban en bloques de parafina se utilizó el método de Marchetti (Marchetti y cols., 1998), se realizaron tres cortes de 12 mm de grosor en un micrótopo, para evitar contaminación de ADN de cada muestra se utilizaron navajas nuevas y se cambió la cinta del microtomo, se lavaron con xilol y etanol al 100%, después cada muestra se colocó en un tubo eppendorf y se calentaron a 60°C para disolver la parafina, después se agregó xilol y se agitó por 10 segundos en vórtex y se dejó en reposo por 30 minutos; se centrifugó durante 5 minutos a $12\,000 \times g$, el sobrenadante se desechó, se agregó de nuevo xilol y se dejó en reposo otros 30 minutos; para eliminar el exceso de xilol se añadió

etanol al 100% y se agitó por 10 segundos en el vórtex, se centrifugó a 12,000g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla durante 30 minutos a temperatura ambiente; se re-suspendió en un volumen final de 500µl de buffer TE; se agregó 50 µl de lisozima y se incubó por dos horas a 37°C; después se añadió 30 µl de proteinasa K y se incubó de 2-3 horas a 56°C o durante la noche a 37°C; se continuó la extracción con la adición de SDS como se comentó anteriormente.

9.4. Identificación de especie

Se homogenizaron las concentraciones de los aislamientos a 20 ng/µl y se utilizaron primers específicos (Ver TABLA 1) para especies de *M. leprae* y *M. lepromatosis*. Se realizaron reacciones de PCR para amplificación de bandas de tamaño conocido (488 pb para *M. leprae* y 244 pb para *M. lepromatosis*) que permitieron identificar muestras con positividad para cualquiera de los dos microorganismos (34).

TABLA 1.

Primers para identificación de especie.

<i>M. leprae</i>		<i>M. lepromatosis</i>	
RLEP-7	5'- TGA GGC TTC GTG TGC TTT GC - 3'	LPM244F	5' - GTT CCT CCA CCG AGA AAC AC - 3'
RLEP-8	5'- ATC TGC GCT AGA AGG TTG CC - 3'	LPM244R	5' – TTC GTG AGG TAC CGG TGA AA - 3'

9.5. Identificación de especímenes de *Dasypus novemcinctus* infectados

Utilizamos el *ML Flow Test*, una herramienta que permite detectar anticuerpos anti-PGL-I, en suero de ejemplares de *Dasypus novemcinctus* con signos clínicos de enfermedad (Alteraciones morfológicas en áreas topográficas como nariz, orejas, extremidades) provenientes de áreas geográficas donde se reportan casos clínicos en seres humanos, de acuerdo a nuestra base de datos. Aquellos que mostraron positividad en dicha prueba fueron canalizados de acuerdo a las regulaciones sanitarias correspondientes para obtener tejido (Sistema tegumentario y reticuloendotelial) que se procesó para posterior estudio histopatológico, bacilosκόpico y molecular, y permitiendo de esta forma relacionar los hallazgos con los obtenidos en seres humanos.

9.6. Identificación de *M. leprae* y *M. lepromatosis* en muestras de suelo.

Se recolectaron muestras de suelo húmedo de 8 municipios (Cadereyta, Montemorelos, Doctor González, Guadalupe, Juárez, Los Ramones, General Terán y Linares) a una profundidad de 5cm) en áreas sin luz solar y se almacenaron en tubos de 50 ml (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). Se extrajo ADN de 10 g de suelo utilizando DNeasy PowerMax Soil (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante.

9.7. Detección y tipificación por SNP

Para determinación de SNP, se utilizaron los primers descritos previamente por Monot y cols. (Ver TABLA 2, 2005) para llevar a cabo PCR. Los productos de PCR fueron sujetos a un protocolo que utilizó enzimas de restricción descrito por Sakamuri y Cols. (2009)(9) utilizando las enzimas SmlI, CviKI-1, BstUI para SNP1, 2 y 3 respectivamente. Los productos de PCR (10 µL) fueron digeridos con una unidad de las enzimas. Las reacciones de SmlI, CviKI-1 y BstUI se realizaron a 55°C, 60°C y 37°C, respectivamente por 1 horas. Los productos predigeridos y digeridos se corrieron en un gel de agarosa con buffer TAE1x al 3%, utilizando GelRed Nucleic Acid Gel Stain para visualizar el resultado utilizando un fotodocumentador con radiación UV.

TABLA 2.

Primers utilizados para SNP

Primers for SNP typing			
SNP 14676	AATGGAATGCTGGTGAGAGC	CAATGCATGCTAGCCTTAAT GA	194
SNP 1642875	CTCGTCACAAATCCGAGTTTGA AT	GTAGTAGTCTTCCAAGTTGT GGTG	114
SNP 2935685	ATCTGGTCCGGGTAGGAATC	ACCGGTGAGCGCACTAAG	180
Primers for subtyping			
SNP 8453	GGTCTGCGGACAAGTTGCTA	CAATAGCGCTCAGACACGAC	211
SNP 313361	CACCGGAGACAAAGCTGAT	CTCGGAGACCAAACTTCTCG	200
SNP 61425	TCGTCAAGCCGAAAGAGTTT	CCAGAACACCGAGGGAATAA	243
SNP 832152	CAGTCGGTGTGATGTGTG	TTGAAGGACGACAACCTATGC	203

El uso de las enzimas antes mencionadas, permitió discernir entre diferentes patrones de bandas, los cuales se basan en cepas con secuencias ya conocidas (Ver Figura 1).

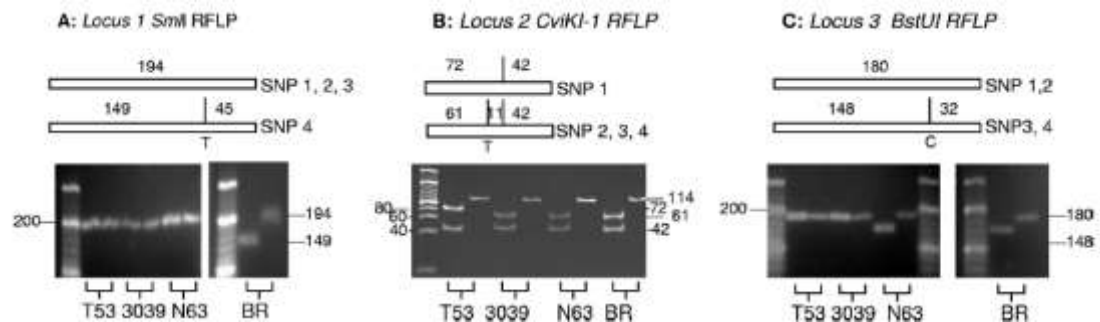


Figura 1. Patrones de bandas de PCR-RFLP de cuatro cepas de *M. leprae* de referencia (T53, 3039, N63, BR). La longitud de las bandas, antes y después de la digestión, es clave para identificar el tipo de SNP de la cepa estudiada.

Imagen extraída de Sakamuri RM, y Cols. Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. J Clin Microbiol. 2009 Sep;47(9):2844-54.

CAPÍTULO X

10.RESULTADOS

10.1. Muestras clínicas

Se obtuvieron 98 biopsias correspondientes a 68 pacientes de la clínica de Hansen de nuestro hospital. El 82% (56) fueron biopsias de tejido fresco y el 18% (12) restante fueron biopsias de tejido embembido en parafina. Tomando en cuenta los hallazgos en la exploración física, la baciloscopía y el estudio histopatológico, el 59% de ellos tenían Lepra Lepromatosa (LL); 6%, Lepra Dimorfa (LD); 7%, Lepra Tuberculoide (LT); 6%, Lepra Indeterminada (LI); 3%, Lepra Histioides (LH); 2%, tenían hallazgos de LL y LT; 1% en vigilancia postratamiento de LL y en 16% no se tenían datos sobre el subtipo clínico de la enfermedad (Ver Figura 2).

Respecto al origen geográfico de los pacientes se encontraron los siguientes datos: el 25% residía en Monterrey; 12%, en Cadereyta; 6% en Apodaca; 4% en

San Nicolás de los Garza, Guadalupe, Montemorelos y Lampazos de Naranjo, respectivamente; 3% en Linares, Juárez, Pesquería y Escobedo, respectivamente; 1% en Camargo (Tamaulipas), Nuevo Laredo (Tamaulipas), Los Ramones, Sabinas Hidalgo, San Pedro Garza García, Ciudad Victoria (Tamaulipas), Anáhuac, General Terán y García, respectivamente. En el 15% de los casos, no fue posible especificar el origen geográfico del paciente (Ver TABLA 3).

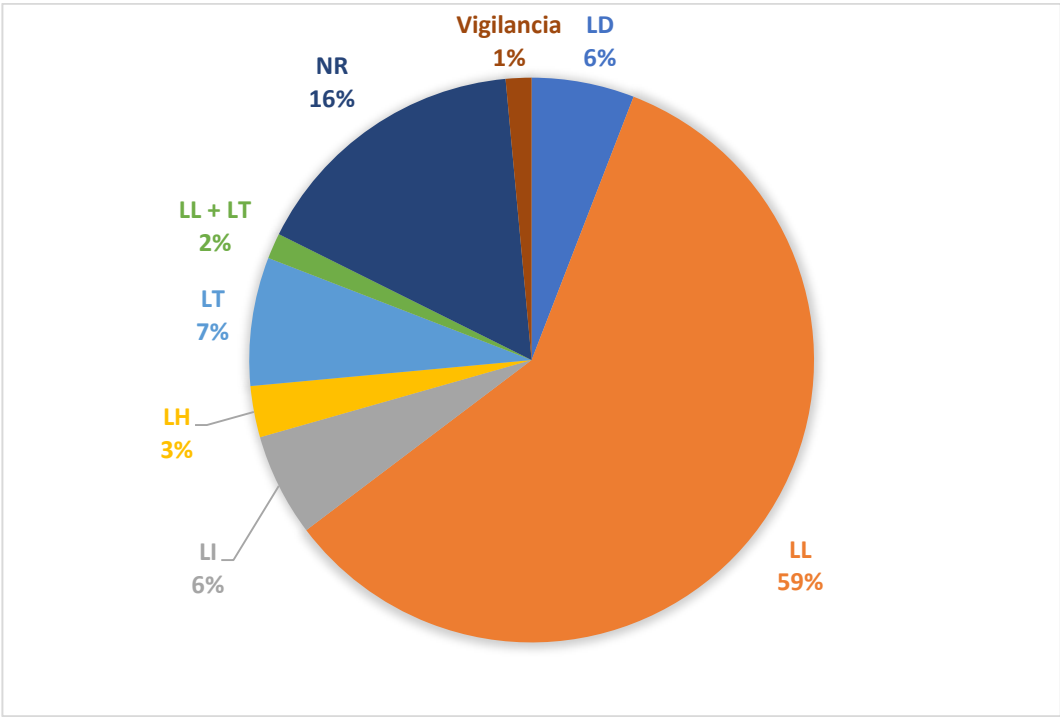


Figura 2. Subtipo clínico de la enfermedad.

TABLA 3.

Origen geográfico de los pacientes.

Origen (Municipio y/o Estado)	Frecuencia (Porcentaje)
Monterrey	17 (25)

NR	10 (15)
Cadereyta	8 (12)
Apodaca	4 (6)
San Nicolás de los Garza	3 (4)
Guadalupe	3 (4)
Lampazos de Naranjo	3 (4)
Montemorelos	3 (4)
Juárez	2 (3)
Pesquería	2 (3)
Escobedo	2 (3)

TABLA 3 (Continúa)

Origen (Municipio y/o Estado)	Frecuencia (Porcentaje)
Linares	1 (1)
Camargo (Tamaulipas)	1 (1)
Nuevo Laredo (Tamaulipas)	1 (1)
Los Ramones	1 (1)
Sabinas Hidalgo	1 (1)
García	1 (1)
San Pedro Garza García	1 (1)
Ciudad Victoria (Tamaulipas)	1 (1)
Anáhuac	1 (1)
General Terán	1 (1)
Total	68 (100)

10.2. Aislamiento y extracción de ADN micobacteriano.

Se extrajo el ADN de la totalidad de las muestras utilizando el método de Van Embdem para biopsias de tejido fresco y el método de Marchetti para las biopsias de tejido embebido en parafina. Las concentraciones promedio de ADN se muestran en la TABLA 4.

13.3 Identificación de especies.

Después de que se homogenizaron las concentraciones de los aislamientos a 20 ng/ μ l, se utilizaron los primers específicos para especies de *M. leprae* y *M. lepromatosis*. Se lograron identificar 28 muestras positivas para infección por *M.*

leprae y ninguna positiva para infección por *M. lepromatosis*. Los hallazgos se muestran en la TABLA 4.

TABLA 4.
Concentración de ADN de biopsias de pacientes.

Número consecutivo	Tipo de biopsia	Concentración promedio (ng/ μ L)	Positividad <i>M. leprae</i> (RLEP)	Positividad <i>M. lepromatosis</i> (LPM244)
1	F	140.15	0	0
2	F	320.23	0	0
3	F	170.50	1	0
4	F	21.53	0	0
5	F	47.91	0	0
6	F	4.23	0	0
7	F	102.75	0	0
8	F	140.50	0	0
9	F	3270.85	0	0
10	F	178.50	1	0
11	F	216.50	0	0
12	F	162.00	1	0
13	F	209.45	1	0
14	F	386.35	1	0
15	F	83.00	0	0
16A	F	400.90	1	0
16B	F	184.55	0	0
17	F	762.70	0	0
18	F	22.50	0	0
19	F	225.75	0	0
20	F	47.60	0	0
21	F	157.35	1	0
22	F	347.50	1	0
23	F	128.50	0	0
24	F	245.50	0	0
25	F	1100.00	1	0
26	F	1188.50	0	0
27	F	88.00	0	0
28	F	159.60	0	0
29	F	25.70	0	0
30	F	109.50	0	0

31	F	2744.25	0	0
32	F	38.60	0	0
33	F	1272.50	0	0
34	F	1047.90	1	0
35	F	328.25	1	0
36	F	2605.30	1	0
37	F	451.90	0	0
38	F	53.20	0	0
39	F	110.05	1	0
40	F	425.17	1	0

TABLA 4 (Continúa)

Número consecutivo	Tipo de biopsia	Concentración promedio (ng/μL)	Positividad <i>M. leprae</i> (RLEP)	Positividad <i>M. lepromatosis</i> (LPM244)
41	F	622.40	1	0
42A	F	680.50	0	0
42B	F	226.20	0	0
43	F	613.73	1	0
44	F	752.80	0	0
45	F	1484.00	0	0
46	F	20.45	1	0
47	F	3120.00	1	0
48	F	1204.30	0	0
49	F	15.50	1	0
50	F	913.30	0	0
51	F	93.30	1	0
52	F	299.10	0	0
53	F	76.20	0	0
54	F	1963.50	0	0
55	F	72.20	1	0
56	F	82.90	0	0
57A	F	791.75	0	0
57B	F	220.10	1	0
58	F	511.90	0	0
59	F	1281.25	1	0
60	F	68.45	1	0
61	F	246.45	1	0
62	F	25.60	1	0
63	F	55.70	0	0
64	F	111.45	1	0
65	F	53.65	0	0
66	F	159.50	0	0
67	F	44.50	0	0
68	F	136.35	0	0
69	F	604.60	0	0
70	F	25.85	0	0
71	F	584.90	0	0
72	F	333.20	0	0
73	F	14.80	0	0

74	F	1.30	0	0
75	F	278.43	0	0
76	F	49.75	0	0
77	F	22.86	0	0
78	F	8.25	0	0
80	P	134.8	0	0
81	P	113.4	0	0
82	P	118.45	0	0
83	P	115.75	0	0
84	P	111	1	0

TABLA 4 (Continúa)

Número consecutivo	Tipo de biopsia	Concentración promedio (ng/μL)	Positividad <i>M. leprae</i> (RLEP)	Positividad <i>M. lepromatosis</i> (LPM244)
85	P	106	0	0
86	P	164	0	0
87	P	167	0	0
88	P	117	0	0
89	P	95	0	0
90	P	81.1	0	0
91	P	107.85	0	0
92	P	108.2	0	0
93	P	173.2	0	0
94	P	97.15	0	0
95	P	49.7	0	0

F: Biopsia de tejido fresco; P: Biopsia de tejido embebido en parafina; 0: Negativo; 1: Positivo.

13.4 Identificación de especímenes de *Dasypus novemcinctus* infectados

Se recolectaron 6 especímenes de armadillos de nueve bandas. Se procesaron biopsias de Hígado, Pulmón, Bazo y Piel (Oreja) de cada uno de ellos para análisis histopatológico, baciloscópico y molecular. 1 de ellos, mostró positividad en el estudio histopatológico, baciloscópico y molecular en Hígado, Pulmón y Piel de oreja (A1, Figuras 3-6). 2 de ellos (A2 y A3), solo mostraron

positividad en el estudio molecular de Oreja. El resto de los especímenes, no tuvo hallazgos sugestivos de infección por estas micobacterias en el estudio histopatológico, bacilosκόpio y molecular. (Ver TABLA 5).

TABLA 5.

Relación de muestras de Armadillo

Número	Clave	Municipio	Histopatología	Bacilosκόpia	Estudio molecular	Especie
1	A1	Soto La Marina	+	+	+	<i>M. leprae</i>
2	A2	Montemorelos	-	-	+	<i>M. leprae</i>
3	A3	Sabinas Hidalgo	-	-	-	
4	A4	Santiago	-	-	-	-
5	A5	Lampazos	-	-	-	-
6	A6	Cadereyta	-	-	-	-

(+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo

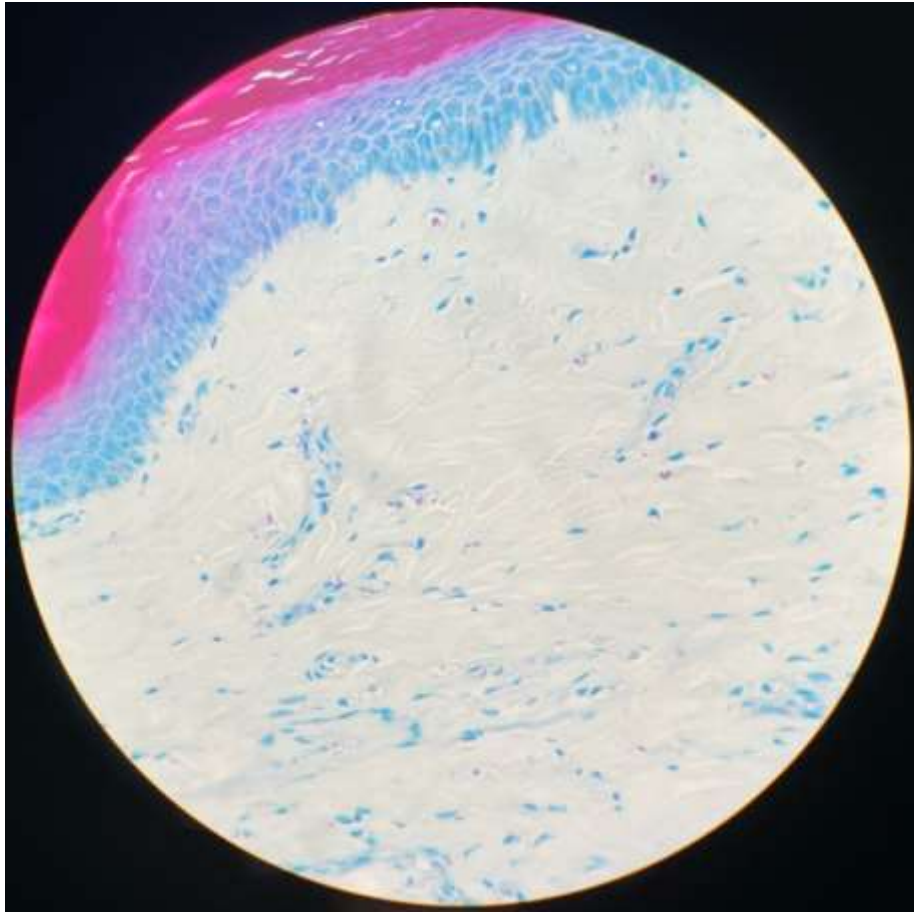


Figura 3. Biopsia de piel de armadillo (10x, Fite Faraco), donde se aprecian múltiples bacilos ácido alcohol-resistentes en dermis superficial y profunda.

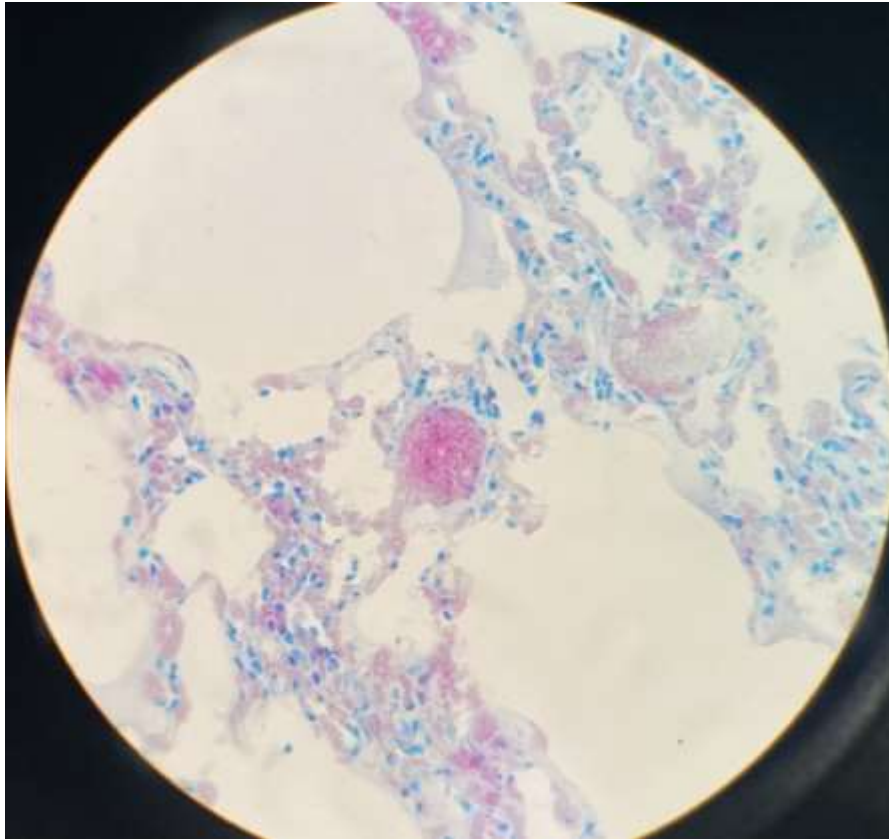


Figura 4. Biopsia de pulmón de armadillo (10x, Fite Faraco), donde se aprecian múltiples bacilos ácido alcohol-resistentes formando globias en los alveolos pulmonares.

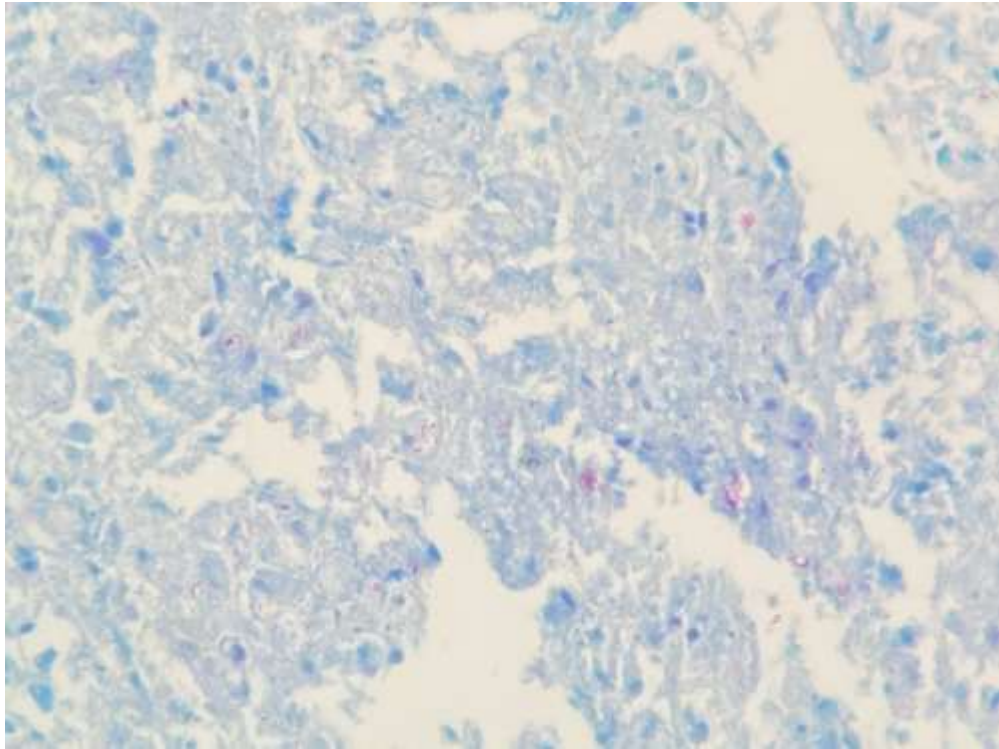


Figura 5. Biopsia de hígado de armadillo (10x, Fitte Faraco), donde se aprecian múltiples bacilos ácido alcohol-resistentes.

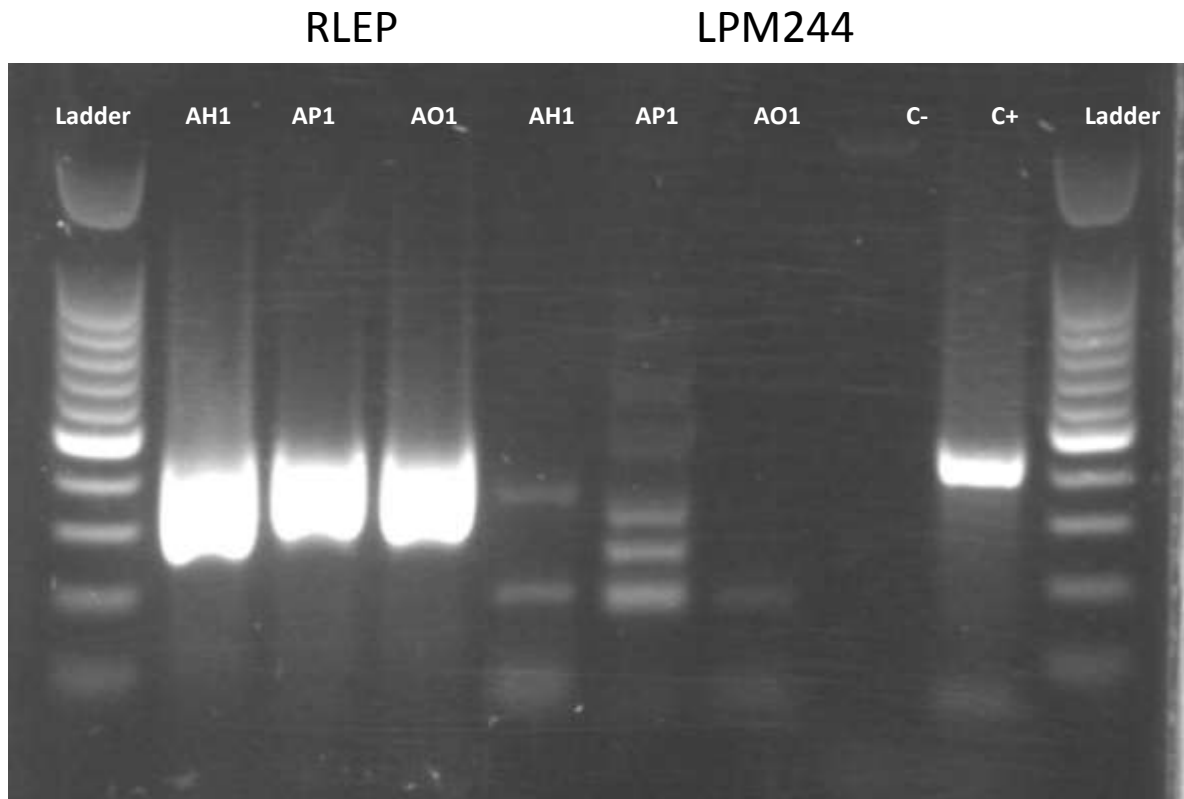


Figura 6. Analisis por PCR, positivo para la presencia de *M. leprae* en Hígado, Pulmón y Piel de Oreja en el Armadillo 1 (A1).

Ladder: Marcador de 100 pares de bases; AH1: Hígado de Armadillo 1; AP1: Pulmón de Armadillo 1; AO1: Piel de Oreja de Armadillo 1; C-: Control negativo; C+: Control positivo.

13.5 Aislamiento de *M. leprae* y *M. lepromatosis* en muestras de suelo.

Se lograron obtener 60 muestras de suelo, proveniente de 8 municipios del estado de Nuevo León. Se logró aislar material genético de la totalidad de ellas utilizando el kit DNeasy PowerMax Soil (Qiagen, Valencia, CA) y se logró identificar *M. leprae* en solo dos de ellas provenientes de Cadereyta y Juárez. Los hallazgos de las muestras de suelo se resumen en la TABLA 6.

TABLA 6.

Relación de muestras de Tierra

Muestra	Origen	Promedio Concentración DNA ng/μl	Agente identificado por PCR
T1	Montemorelos	44.8	Negativo
T2	Montemorelos	11.3	Negativo
T3	Montemorelos	15.4	Negativo
T4	Montemorelos	13.1	Negativo
T5	Montemorelos	41.0	Negativo
T6	Montemorelos	41.5	Negativo
T7	Montemorelos	4.0	Negativo
T8	Montemorelos	9.2	Negativo
T9	Montemorelos	21.7	Negativo
T10	Montemorelos	30.8	Negativo
T11	Montemorelos	16.3	Negativo
T12	Montemorelos	6.9	Negativo
T13	Cadereyta	17.2	Negativo
T14	Cadereyta	18.5	Negativo
T15	Cadereyta	2.0	Negativo
T16	Cadereyta	2.0	<i>M. leprae</i>
T17	Cadereyta	38.8	Negativo
T18	Cadereyta	32.1	Negativo
T19	Cadereyta	20.1	Negativo

TABLA 6 (Continúa)

Muestra	Origen	Promedio Concentración	Agente identificado
---------	--------	---------------------------	------------------------

		DNA ng/μl	por PCR
T20	Cadereyta	17.1	Negativo
T21	Cadereyta	1.9	Negativo
T22	Cadereyta	3.3	Negativo
T23	Cadereyta	5.6	Negativo
T24	Cadereyta	3.7	Negativo
T25	Dr González	14.0	Negativo
T26	Dr González	36.5	Negativo
T27	Dr González	206.2	Negativo
T28	Dr González	278.8	Negativo
T29	Juárez	268.5	Negativo
T30	Juárez	12.4	<i>M. leprae</i>
T31	Juárez	15.9	Negativo
T32	Juárez	19.2	Negativo
T33	Juárez	360.6	Negativo
T34	Juárez	20.3	Negativo
T35	Cadereyta	31.2	Negativo
T36	Cadereyta	16.8	Negativo
T37	Cadereyta	45.0	Negativo
T38	Cadereyta	37.2	Negativo
T39	Guadalupe	14.7	Negativo
T40	General Terán	8.8	Negativo
T41	Guadalupe	9.1	Negativo
T42	Cadereyta	24.9	Negativo
T43	Guadalupe	10.5	Negativo
T44	General Terán	17.0	Negativo
T45	General Terán	42.1	Negativo
T46	General Terán	10.4	Negativo
T47	General Terán	53.3	Negativo
T48	General Terán	14.2	Negativo
T49	Linares	14.8	Negativo
T50	Guadalupe	6.6	Negativo
T51	Linares	64.3	Negativo
T52	General Terán	5.3	Negativo
T53	Cadereyta	19.3	Negativo
T54	Cadereyta	30.5	Negativo
T55	Los Ramones	3.7	Negativo
T56	Los Ramones	5.4	Negativo
T57	Cadereyta	5.9	Negativo
T58	Cadereyta	24.5	Negativo
T59	Cadereyta	5.4	Negativo
T60	Cadereyta	11.7	Negativo

10.6. Detección y tipificación por SNP

Utilizando los primers descritos previamente, logramos identificar el tipo y el subtipo de una parte de las muestras, siendo 3I el genotipo predominante. En la TABLA 7 se resumen los resultados, especificando el origen, el tipo y subtipos disponibles de los aislamientos clínicos.

TABLA 7.

Tipos y Subtipos de SNP identificados

Muestra	Especie identificada	Origen	SNP Tipo	SNP Subtipo
F3	<i>M. leprae</i>	Linares	3	
F10	<i>M. leprae</i>	Apodaca	3	
F13	<i>M. leprae</i>	Monterrey	3	
F14	<i>M. leprae</i>	Cadereyta	3	
F16A	<i>M. leprae</i>	Apodaca	3	
F21	<i>M. leprae</i>	Monterrey	3	I
F22	<i>M. leprae</i>	Escobedo	3	
F25	<i>M. leprae</i>	General Terán	3	I
F34	<i>M. leprae</i>	Apodaca	3	
F35	<i>M. leprae</i>	Los Ramones	3	
F36	<i>M. leprae</i>	Monterrey	3	I
F39	<i>M. leprae</i>	San Nicolás de los Garza	3	
F40	<i>M. leprae</i>	Monterrey	3	
F41	<i>M. leprae</i>	Cadereyta	3	I
F43	<i>M. leprae</i>	San Nicolás de los Garza	3	
F46	<i>M. leprae</i>	Lampazos de Naranjo	3	
F47	<i>M. leprae</i>	Lampazos de Naranjo	3	
F49	<i>M. leprae</i>	Camargo	3	
F51	<i>M. leprae</i>	Monterrey	3	

TABLA 7 (Continúa)

Muestra	Especie identificada	Origen	SNP Tipo	SNP Subtipo
F55	<i>M. leprae</i>	Sabinas Hidalgo	3	

F57B	<i>M. leprae</i>	Sabinas Hidalgo	3	
F59	<i>M. leprae</i>	Juarez	3	I
F60	<i>M. leprae</i>	Tamaulipas	3	
F61	<i>M. leprae</i>	Sabinas Hidalgo	3	
F62	<i>M. leprae</i>	Sabinas Hidalgo	3	
P84	<i>M. leprae</i>	Monterrey	3	
A1	<i>M. leprae</i>	Soto La Marina	3	I
A2	<i>M. leprae</i>	Montemorelos	3	
T16	<i>M. leprae</i>	Cadereyta		
T30	<i>M. leprae</i>	Juárez		

CAPÍTULO XI

11. DISCUSIÓN

La lepra es una enfermedad que afecta generalmente a países en desarrollo, con la mayor proporción de casos reportados en la India, China, Myanmar, Indonesia, Brazil, Nigeria, Madagascar y Nepal (14). La lepra también es endémica de México y se concentra fundamentalmente en los estados de Michoacán, Guerrero, Nayarit, Sinaloa, Sonora, Jalisco y Nuevo León (17,19). Sin embargo, la distribución de los casos en estas regiones no es uniforme, permitiendo identificar grupos de casos, sin clara asociación epidemiológica entre sí. Se ha sugerido que en estos países endémicos, más del 50% de los pacientes con la enfermedad tuvo contacto con una persona infectada (a través de gotas respiratorias), sin embargo tal porcentaje es variable y puede ser mucho menor en países no endémicos (35–37). En estas situaciones, probablemente el paciente adquirió la enfermedad de otras fuentes presentes en su ambiente local, como animales no humanos y fuentes ambientales (12,32).

La biología molecular es una herramienta valiosa para poder rastrear el contacto entre pacientes infectados y entre pacientes y otras fuentes de infección. Mediante el análisis de polimorfismos de nucleótido único, se han podido rastrear patrones filogenéticos a nivel mundial y estudiar la dinámica de transmisión entre diferentes comunidades (38–42).

En este estudio aislamos ADN de *M. leprae* proveniente de biopsias de pacientes con Lepra, diferentes tejidos de armadillos y de muestras de suelo. Se encontró que el genotipo predominante en el estado (ADN aislado de biopsias de pacientes, armadillo y muestras de suelo) fue 3I, el cual fue similar a lo encontrado en el sureste de Estados Unidos, particularmente en Texas (12), costa este, sur, suroeste y sureste de México (43).

Otros estudios epidemiológicos realizados en Estados Unidos y en Brazil, han enfatizado la importancia del contacto estrecho con armadillos como un factor de riesgo para la infección por el bacilo causante de la enfermedad de Hansen (44–47). La totalidad de los pacientes en los que se aisló *M. leprae* habían tenido contacto directo con especímenes de Armadillo (Como alimento o actividades al aire libre), sin embargo, ninguno de ellos corresponde a los presentados en este estudio. La seroprevalencia de *M. leprae* en armadillos en nuestro estado se desconoce, pero sería posible conocerla mediante la identificación de anticuerpos PGL1 en muestras de sangre. A pesar de ello, es seguro incentivar evitar el consumo o contacto estrecho con tales animales, en población susceptible.

Las muestras de suelo se obtuvieron de las madrigueras o en la proximidad de las madrigueras de armadillos, considerando que la tierra representa un reservorio para el bacilo de la lepra. En este estudio se demostró la presencia de ADN de *M. leprae*, el cual corresponde al genotipo encontrado en humanos y armadillos y contribuyendo con esto a enfatizar la importancia

que tiene el ambiente en la transmisión del bacilo (Ya sean bacterias viables o recidiendo en hospederos microscópicos como las amibas de tierra) (32).

Estos resultados, sugieren que la biología molecular es una herramienta útil para determinar el origen y evolución de diferentes cepas de *M. leprae*, ya que el genotipo predominante en cepas europeas también es 3I, lo que hace posible rastrear la introducción de la enfermedad en América después de la conquista española (8) lo cual también es consistente con los hallazgos paleológicos de restos humanos con signos de la enfermedad que se limitan al periodo posterior a la conquista (48).

Si bien la biología molecular tiene estas ventajas, también tiene limitaciones. La obtención de ADN de *M. leprae* o *M. lepromatosis* es complicado debido a que es un microorganismo no cultivable in-vitro, tiene un prolongado periodo de incubación, calidad o cantidad inadecuada de las muestras, pobre seguimiento por parte de los pacientes, falsos positivos y negativos durante la amplificación del material genético debido a contaminación con nucleasas u otros amplicones ambientales. La falta de muestras positivas para *M. lepromatosis* evidencia la poca frecuencia con la que se aísla tal microorganismo y justifica el seguir buscando en biopsias, sobre todo en pacientes con cuadros clínicos aparatosos.

CAPÍTULO XII

12. CONCLUSIÓN

Se requieren nuevas estrategias para detectar la Lepra y prevenir su diseminación. El uso de la biología molecular es imperativo para lograr disminuir la brecha de la incertidumbre diagnóstica en casos donde la imagen clínica o histopatológica, no es clara. La biología molecular permitió definir que el genotipo predominante en nuestro estado es similar al encontrado en el sur de Estados Unidos, costa este, sur, suroeste y sureste de México además de Europa.

Utilizando la biología molecular y mediante el análisis de polimorfismos genéticos de muestras de pacientes, armadillos y suelo, se pueden rastrear brotes de la enfermedad y actuar proactivamente para la búsqueda de nuevos casos, proveer un tratamiento temprano y evitar la propagación de la enfermedad.

CAPÍTULO XIII

REFERENCIAS

1. Lavania M, Jadhav R, Turankar RP, Singh I, Nigam A, Sengupta U. Genotyping of *Mycobacterium leprae* strains from a region of high endemic leprosy prevalence in India. Infect Genet Evol. 2015. Dec;36:256-261.
2. Mark S. Early Human Migrations (ca . 13 , 000 Years Ago) or Postcontact Europeans for the Earliest Spread of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* to the Americas. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2017;2017:6491606.
3. Walsh GP, Meyers WM, Binford CH. Naturally Acquired Leprosy in the Nine-Banded Armadillo: A Decade of Experience 1975-1985. J Leukoc Biol. 2018; Nov;40(5):645-56.
4. Folse DS, Smith JH. Leprosy in wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*) on the Texas Gulf Coast: anatomic pathology. J Reticuloendothel Soc. 1983; Nov;34(5):341-57.
5. Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. Am J Clin Pathol. 2008; Dec;130(6):856-64.
6. Vera-cabrera L, Escalante-fuentes WG, Gomez-flores M, Ocampo-candiani J, Busso P, Singh P, et al. Case of Diffuse Lepromatous Leprosy

- Associated with “ *Mycobacterium lepromatosis* ”. *J Clin Microbiol*. 2011;49(12):4366–8.
7. WHO. WHO | Leprosy. World Heal Organ. 2014;
 8. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*. 2009; Dec;41(12):1282-9.
 9. Gillis T, Vissa V, Richardus JANH, Truman R, Hall B, Brennan P, et al. Characterisation of Short tandem repeats for genotyping *Mycobacterium leprae*. 2009 Sep;80(3):250–60.
 10. Avanzi C, Del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science* 2016. Nov 11;354(6313):744-747.
 11. Ploemacher T, Faber WR, Menke H, Rutten V, Pieters T. Reservoirs and transmission routes of leprosy; A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Apr 27;14(4):e0008276.
 12. Sharma R, Singh P, Loughry WJ, Lockhart JM, Inman WB, Duthie MS, et al. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. 2015;21(12):2127–34.
 13. Honap TP, Pfister L, Housman G, Mills S, Tarara P, Suzuki K, et al. *Mycobacterium leprae* genomes from naturally infected nonhuman primates. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Jan 30;12(1):e0006190.
 14. Lavania M, Jadhav R, Turankar RP, Singh I, Nigam A, Sengupta U. Genotyping of *Mycobacterium leprae* strains from a region of high endemic leprosy prevalence in India. *Infect Genet Evol*. 2015 Dec;36:256–

- 61.
15. Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect.* 2015 Sep;45(9):383–93.
 16. WHO. Global leprosy update, 2016: accelerating reduction of disease burden. *Wkly Epidemiol Rec.* 2017;92(35):501–20.
 17. Han XY, Sizer KC, Verlarde-Félix JS, Frias-castro LO, Vargas-ocampo F. The leprosy agents *Mycobacterium lepromatosis* and *Mycobacterium leprae* in Mexico. *Int J Dermatol.* 2012 Aug;51(8):952-9.
 18. Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico Eliminación de la Lepra 2013-2018.
 19. Boletín Epidemiológico Semana 47, 2018 [Internet]. 2018.
 20. Payeur JB. *Mycobacterium*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition.* 2014.
 21. G. Rodríguez. *Temas De Bacteriología Y Virología Médica.* 2015;381–401.
 22. National Center for Environmental Health D of E and EHS. Massive gene decay in the leprosy. *Centers Dis Control Prev.* 2001;1007–11.
 23. Han XY, Silva FJ. On the Age of Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Feb 13;8(2):e2544.
 24. Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: Insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infect Genet Evol.* 2008 Sep;8(5):627-31.
 25. Mohanty PS, Naaz F, Katara D, Misba L, Kumar D, Dwivedi DK, et al.

- Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. Jan-Feb 2016;82(1):23-7.
26. Conger NG, O'Connell RJ, Laurel VL, Olivier KN, Graviss EA, Williams-Bouyer N, et al. *Mycobacterium simiae* Outbreak Associated With a Hospital Water Supply . *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004 Dec;25(12):1050-5.
 27. Blake LA, West BC, Lary CH, Todd JR. Environmental nonhuman sources of leprosy. *Rev Infect Dis*. May-Jun 1987;9(3):562-77.
 28. Matsuoka M, Izumi S, Budiawan T, Nakata N, Saeki K. *Mycobacterium leprae* DNA in daily use water as a possible source of leprosy infection. *Int J Lepr*. Jan-Mar 1999;71(1):61-7.
 29. Kazda J, Ganapati R, Revankar C, Buchanan TM, Young DB, Irgens LM. Isolation of environment-derived *Mycobacterium leprae* from soil in Bombay. *Lepr Rev*. 1986;57
 30. Lahiri R, Krahenbuhl JL. The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle. *Lepr Rev*. 2008 Dec;79(4):401-9.
 31. Sreevatsa. Leprosy and arthropods. *Indian J Lepr*. Apr-Jun 1993;65(2):189-200.
 32. Tió-Coma M, Wijnands T, Pierneef L, Schilling AK, Alam K, Roy JC, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in soil: multiple needles in the haystack. *Sci Rep*. 2019 Feb 28;9(1):3165.
 33. Groathouse NA, Rivoire B, Kim H, Lee H, Cho SN, Brennan PJ, et al.

- Multiple Polymorphic Loci for Molecular Typing of Strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol*. 2004 Apr;42(4):1666-72.
34. Michael Taylor G, Murphy EM, Mendum TA, Pike AWG, Linscott B, Wu H, et al. Leprosy at the edge of Europe—Biomolecular, isotopic and osteoarchaeological findings from medieval Ireland. *PLoS One*. 2018 Dec 26;13(12):e0209495.
 35. Gelber RH. Chapter 166. Leprosy. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18e. 2012.
 36. Bhatia VN, Vanaja G, Rao S, Elango T V. Some observations on skin smear examination. *Indian J Lepr*. Jul-Sep 1990;62(3):338-45.
 37. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: A study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Mar;78(3):518-21.
 38. Cardona-Castro N, Beltrán-Alzate JC, Romero-Montoya IM, Meléndez E, Torres F, Sakamuri RM, et al. Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia. *Lepr Rev*. 2009 Sep;80(3):316-21.
 39. Fontes ANB, Gomes HM, de Araujo MI, de Albuquerque ECA, Baptista IMFD, Moura MM da F, et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* present on Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides and in skin biopsy samples from leprosy patients in different geographic regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Dec;107.
 40. Sakamuri RM, Kimura M, Li W, Kim HC, Lee H, Kiran MD, et al. Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines.

- J Clin Microbiol. 2009 Sep;47(9):2844-54.
41. Shinde V, Newton H, Sakamuri RM, Reddy V, Jain S, Joseph A, et al. VNTR typing of Mycobacterium leprae in South Indian leprosy patients. Lepr Rev. 2009 Sep;80(3):290-301.
 42. Kuruwa S, Vissa V, Mistrya N. Distribution of Mycobacterium leprae strains among cases in a rural and urban population of Maharashtra, India. J Clin Microbiol. 2012 Apr;50(4):1406-11.
 43. Matsuoka M, Gonzalez AV, Estrada I, Carreño-Martinez C, Fafutis-Morris M. Various genotypes of Mycobacterium leprae from Mexico reveal distinct geographic distribution. Lepr Rev. 2009 Sep;80(3):322-6.
 44. Thomas DA, Mines JS, Thomas DC, Mack TM, Rea TH. Armadillo exposure among mexican-born patients with lepromatous leprosy. J Infect Dis. 1987 DEC;156(6):990-2.
 45. Bruce S, Schroeder TL, Ellner K, Rubin H, Williams T, Wolf JE. Armadillo exposure and Hansen's disease: An epidemiologic survey in southern Texas. J Am Acad Dermatol. 2000 Aug;43(2 Pt 1):223-8.
 46. Clark BM, Murray CK, Horvath LL, Deye GA, Rasnake MS, Longfield RN. Case-control study of armadillo contact and Hansen's disease. Am J Trop Med Hyg. 2008 Jun;78(6):962-7.
 47. Deps P, Alves B, Gripp C, Aragão R, Guedes BVS, Filho J, et al. Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: A case control study. Indian J Dermatol Venereol Leprol. Jul-Aug 2008;74(4):338-42.
 48. Ortner DJ. (2003). *Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains*. Elsevier Science.

Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado
Presente. -

14 de diciembre de 2020

Por medio de la presente, me permito saludarlo y a su vez informar que el trabajo de tesis del Dr. **Cesar Jair Ramos Cavazos**, con matrícula **1459225**, titulado *"Epidemiología molecular de Mycobacterium leprae y Mycobacterium lepromatosis en el estado de Nuevo León"* fue evaluado mediante la herramienta **Turnitin** para la detección de similitud y plagio.

Los resultados fueron los siguientes:

- Porcentaje de similitud: 16%
- Similitud máxima con documentos existente: 3%

En base a lo anterior y a la reglamentación de no superar un 30% de similitud, me permito dictaminar que no considero que exista evidencia de plagio en el trabajo.

Se adjunta el dictamen de Turnitin en caso de ser requerido para su verificación

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente,
"Alere Flamman Veritatis"
Monterrey, N.L., 14 diciembre 2020.



Dra. Med. Minerva Gómez Flores
Coordinador de Enseñanza de Posgrado del
Programa de Especialización en Dermatología

SERVICIO DE DERMATOLOGÍA
Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Av. González, Col. Mitras Centro.
C.P. 64460, Monterrey, N.L., México. Tel.: (81) 8348 1485.
Consultador: (81) 8369 1111, ext. 2199, Fax: (81) 8348 4407
www.dermatologiauanl.com



DERMATOLOGÍA
HOSPITAL UNIVERSITARIO

Turnitin Informe de Originalidad

Procesado el: 14-dic.-2020 8:36 a. m. CST
 Identificador: 1474699783
 Número de palabras: 9872
 Entregado: 1

Índice de similitud
16%

Similitud según fuente
 Internet Sources: 15%
 Publicaciones: 2%
 Trabajos del estudiante: 9%

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE
 MYCOBACTERIUM LEPRAE Y
 MYCOBACTERIUM

LEPROMATOSIS EN EL ESTADO

DE NUEVO LEÓN Por Cesar Jair
 Ramos Cavazos

3% match (trabajos de los estudiantes desde
 01-ago.-2016)

Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo

León on 2016-08-01

2% match (Internet desde 05-jun.-2017)

<http://docplayer.es/4038131-Mycobacterias-importancia-g-rodriguez-pagina-381-il-bacili-non-e-ancora-tutta-la-tuberculosi-g-bacelli-1882.html>

1% match (Internet desde 13-ene.-2019)

http://dasc.online/wp-content/uploads/2017/08/PAE_Lepra.pdf

1% match ()

<http://eprints.uanl.mx/2855/1/1080221599.pdf>

1% match (Internet desde 24-nov.-2017)

<http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2024.pdf>

1% match (Internet desde 18-jul.-2020)

<http://m.exam-10.com/medicina/11226/index.html>

1% match (Internet desde 01-nov.-2019)

https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/181068/valois_ems_dr_bot.pdf?isAllowed=y&sequence=3

< 1% match (trabajos de los estudiantes desde 23-jun.-2020)

Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2020-06-23

< 1% match (Internet desde 21-jul.-2020)

<http://eprints.ucm.es/11626/1/T32337.pdf>

< 1% match (Internet desde 12-may.-2019)

<https://documento.site/18supl-1-medicina-universitaria.html>

< 1% match (trabajos de los estudiantes desde 13-jul.-2020)

Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León on 2020-07-13

< 1% match (Internet desde 10-ago.-2020)

<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00315809>

< 1% match (Internet desde 10-jul.-2019)

<https://scielosp.org/article/rsap/2009.v11n1/3-13/>

< 1% match (Internet desde 22-feb.-2014)

<http://www.iattc.org/PDFFiles2/AnnualReports/IATTC-Annual-Report-1956.pdf>